



10 Record PCT/PTO 22 DEC 2004

25.10.2002 № ПВ-06/2499

RECD 11 NOV 2002

WIPO PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

СПРАВКА

Государственное Патентное Ведомство Республики Узбекистан настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначальных материалов заявки на выдачу предварительного патента на изобретение IDP 2001 0552, поданной в июле месяце 3 дня 2001 года.

Название изобретения: Противоопухолевое средство

Заявитель: Татарский Валерий Петрович

Действительный автор: Татарский Валерий Петрович

Уполномоченный заверить
копию заявки на объекты
промышленной собственности



Зам. директора
B. ЕРМОЛАЕВА

АГЕНЦИЯ ИДОРАСИ
Кенгаш хужжат №
Формат № 1-98

(21) № тобрене борзия
Бз. № 11111111110532

(22) Дата поступления 03 JUL 2001	Входящий № (51)МПК	(23) № государственного ведомства Республики Узбекистан 700047, г. Ташкент, ул. Туйтепа, 2а
Приоритет		

ЗАЯВЛЕНИЕ

о выдаче патента, предварительного патента на изобретение (ненужное зачеркнуть)

Нижеподписавшийся (еся)

(71) Заявитель(и) Татарский Валерий Петрович

Представляя указанные ниже документы, просит(просит) выдать патент, предварительный патент (ненужное зачеркнуть) на ини

Татарского Валерия Петровича

(указывается полное имя или наименование и местожительство или местонахождение заявителя и лица, на чье имя испрашивается охранный документ. Данные о местожительстве авторов-заявителей приводятся в графе с кодом 97)

Код организации,
предприятия по
ОКПО
(если он установлен)
Код страны по стандарту
ВОИС СТ. 3

- Прошу (просим) установить приоритет изобретения по дате:
 подачи первой(ых) заявки(ок) в стране-участнице Парижской конвенции
 поступления более ранней заявки в Патентное ведомство
 поступления тождественной заявки в Патентное ведомство
 поступления дополнительных материалов к более ранней заявке

(Заполняется только при испрашивании приоритета более раннего, чем дата поступления заявки в Патентное ведомство)

(31) № первой, более ранней, тождественной заявки	(32) Дата испрашиваемого приоритета	(33) Код страны подачи по СТ.3 (при испрашивании конвенционного приоритета)
1.		
2.		
3.		

(54) Название изобретения Противоопухолевое средство
Усмага қарши таъсирга эга восита

Шифр проблемы (темы) ГКНТ и т.п.

(74) Патентный поверенный (полное имя, регистрационный номер, местонахождение)

Телефон:

Телекс:

Факс:

(98) Адрес для переписки (полный почтовый адрес, имя или наименование адресата)

700135, г. Ташкент, Чиланзар, кв-л 17, д.33, кв.105, Татарскому В.П.

Телефон: 116-61-61.

Телекс:

Факс:

Перечень прилагаемых документов:		кол-во л. в 1 экз	кол-во экз	Основания для возникно- вения права на подачу заявки и получение охранного документа (без представления доку- мента):
описание изобретения		7	3	<input type="checkbox"/> заявитель является ра- ботодателем и соблю- дены условия ст. 9 Закона
формула изобретения (кол-во независимых пунктов _____)	I	3	<input type="checkbox"/> переуступка права ра- ботодателем иному лицу	
чертеж(и) и иные материалы			<input type="checkbox"/> право наследования	
реферат	I	3		
документ об уплате пошлины за подачу заявки за ускорение	I	I		
документ, подтверждающий наличие оснований для: освобождения от уплаты пошлины уменьшения размера пошлины копия(и) первой(ых) заявки(ок) при испрашивании конвенционного приоритета)				
перевод заявки на русский язык доверенность, удостоверяющая полномочия патентного поверенного				
другой документ (указать)				

(72) Автор(ы) (фамилия, имя, отчество, должность, ученая степень и место работы)	(97) Полный домашний адрес (область, район, город, улица, дом, для иностран- цев - код страны по стандарту ВОИС СТ.3)	Подпись(и) автора(ов), дата
Татарский Валерий Петрович , доктор биологических наук, профессор, неработающий пенсионер	700135, г.Ташкент, Чиланзар, кв-л 17, дом.33, кв.105	 03.07.01

.. Я(мы) _____
(полное имя)

прошу(просим) не упоминать меня(нас) как автора(авторов) при публикации сведений о выдаче охранного
документа

Подпись (и) автора(ов):

Подпись
03.07.01.

имя(и) заявителя(ей) или патентного поверенного, лица, на чье имя испрашивается охранный документ, дата подписи(ей)
(при исписании от имени юридического лица подпись руководителя удостоверяется печатью)

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в клинической онкологии.

Известен способ получения противоопухолевого средства путем смешения водного раствора, содержащего ДНК и хлорид натрия, и водного раствора цитостатика, причем в качестве цитостатика используют тетрахлороплатинит калия, перед смешением в раствор ДНК добавляют натрия цитрат; в раствор цитостатика — хлорид аммония, хлорид калия и ацетат калия; при этом каждый раствор нагревают до температуры плавления ДНК (а.с. N 1701323, А 61 К 45/05, БИ N 48, 1991г.).

Однако средство сложно по составу и проявляет противоопухолевый эффект при высокой дозе введения.

Наиболее близким по технической сущности является комплекс ацетилацетоната меди с сарколизином (МОК), обладающим противоопухолевым действием (п.п. РУз N 1745, А 61 К 31/30, С 07 С 29/74, РА N 2, 1994 г.).

Однако МОК с сарколизином плохо растворим в воде, физиологическом растворе (0,95% NaCl), анестезирующих растворах новокаина, лидокаина и др., при хранении в водных растворах препарат гидролизуется, окисляется и теряет свою активность. Кроме того, сарколизин обладает рядом побочных эффектов и может привести к угнетению кроветворения с уменьшением количества лейкоцитов.

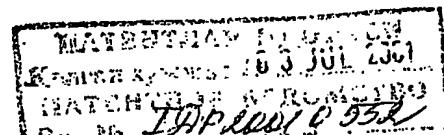
Задачей предлагаемого изобретения является создание противоопухолевого средства, обладающего также иммуномодулирующим действием, растворимостью в гидрофобных средах, повышенной устойчивостью к окислению и гидролизу и не вызывающего лекарственную устойчивость (резистентность).

Поставленная задача решается тем, что противоопухолевое средство состоит из комплекса ацетилацетоната меди с фармацевтическим препаратом, а в качестве фармацевтически приемлемого препарата содержит мелфалан, причем полученный комплекс, обладающий иммуномодулирующим действием и не вызывающий резистентности, подвергают ультразвуковой диспергации врастительном масле или в ненасыщенных жирных кислотах.

Полученное средство полифункционально, т.к. введенный мелфалан более активен, средство, проникая в ядерный аппарат опухолевых клеток, проявляет прооксидантное действие, выполняет роль алкилятора, нарушая структуру ДНК и приводит к гибели клеток. Средство оказывает позитивный эффект на кроветворную систему, предотвращая лейкопению, нормализует соотношение Thelp/Tsupr, увеличивает число антигенообразующих клеток.

Пример 1. 0,6 г сухого комплекса —ацетилацетоната меди с мелфаланом ($Cu(acac)_2M$) диспергируют в 100 мл 100% оливкового масла ультразвуковым генератором УЗДН — 1 с частотой 15 кГц в течение 10 мин. Полученный высокодисперсный раствор $Cu(acac)_2M$ устойчив при длительном хранении (более двух лет).

Пример 2. 0,1 г сухого препарата $Cu(acac)_2M$ диспергируют в 100 мл линолевой или линоленовой кислоты ультразвуковым генератором УЗДН-1 с



частотой 15 кГц в течение 10 мин. Полученный раствор светло-зеленого цвета, устойчив при хранении на воздухе в течение одного года.

Противоопухолевые свойства средства были установлены в экспериментах на культурах различных опухолевых клеток и лабораторных животных-опухоленосителях. Функциональные особенности средства проверялись на модельных системах в биохимических и биофизических тестах.

Противоопухолевые свойства средства проверялись на лабораторных мышах с перевиваемыми опухолями различной этиологии. Результаты экспериментов представлены в табл. 1-7.

Таблица 1

Влияние противоопухолевого средства в озвученном растворе оливкового масла, на опухоль АКАТОН (мыши линии Balb.; средство вводилось внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг в 0,3 мл масла)

Противоопухолевое средство

Мышь	Вес опухоли, г	Размер опухоли, см.	% тормож. опухоли, в среднем
1	0	0	92,0
2	0	0	
3	0,35	0,2x0,2x0,2	
4	1,13	1,4x0,7x0,6	
5	0,8	0,8x0,8x0,5	
6	0	0	
7	0	0	
8	0	0	
9	0,49	0,3x0,2x0,2	
10	Погибла	-	

Средний вес опухоли 0,3 г

Контроль

Мышь	Вес опухоли, г.	Размер опухоли, см.	% тормож. опухоли, в среднем
1	1,61	1,6x1,0x0,7	0,0
2	1,69	2,5x2,0x0,8	
3	6,48	3,6x2,5x1,6	
4	2,93	3,0x1,0x0,7	
5	3,75	3,5x1,5x0,7	
6	2,56	3,1x1,0x1,7	
7	3,69	3,0x2,0x1,0	
8	5,22	3,0x2,5x1,0	
9	4,85	3,0x2,0x1,0	
10	3,23	2,6x1,5x1,0	

Средний вес опухоли 3,6 г

Таблица 2

Влияние противоопухолевого средства в озвученном растворе оливкового масла на мышей с саркомой S-180 (при введении внутрибрюшинно беспородным мышам через 48 часов после перевивки)

Препараты	Доза препарата	Количество животных	Масса опухоли, г	% торможения, в среднем
Комплекс	5 мг/кг	6	Опух.нет	100
Мелфалан	5 мг/кг	10	2,4±1,1	38,5
Контроль	-	10	2,8	-

Таблица 3

Влияние противоопухолевого средства в озвученном растворе линоленовой кислоты на аденокарциному тонкого кишечника (АКАТОН) при введении внутривенно 4 раза мышам линии Balb.

Препарат	Доза препарата	Количество животных	Масса опухоли, г	% торможения, в среднем
Комплекс	5 мг/кг	6	0,9	80
Контроль	-	6	4,4	-

Таблица 4

Влияние противоопухолевого средства в озвученном растворе линолевой кислоты на опухоль АКАТОН при введении внутрибрюшинно 4 раза мышам линии Balb.

Препарат	Доза препарата	Количество животных	Масса опухоли, г	% торможения, в среднем
Комплекс	5 мг/кг	5	0,7	84
Контроль	-	5	4,3	-

Изучение противоопухолевой активности и лекарственной устойчивости средства в оливковом масле и ненасыщенных жирных кислотах проводили на опухолевых штаммах лейкемии L-1210, лейкемии Р-388 и специально выведенных опухолях на базе опухоли Р-388. Результаты исследований представлены в табл. 5-7.

Таблица 5

Лейкемия L - 1210

Инокулум: 10^6 клеток в 0,2 мл физраствора; мыши BDF₁, самки весом 19-21 г
Средство в озвученном оливковом масле

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, сутки	Количество животных в опыте	% выживших животных	Продолжительности жизни животных в опыте (сутки)	Изменение веса
Компл.	5	1-7	6	100	60	-1,5
Контроль	-	-	6	0	8,5	+0,7

Препараты вводили внутрибрюшинно.

Таблица 6

Лейкемия Р- 388

Инокулум 10^6 клеток в 0,2 мл физраствора. Мыши: BDF₁, самки весом 19-21 г.
Средство в озвученной линолевой кислоте

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, сутки	Количество животных в опыте	Количество животных, выживших к 60 суткам	Средняя продолжительность, сутки	Увеличение средней продолжительности жизни, %	Изменение веса
Компл.	5	1-7	6	0	16,8	58,0	-2,5
Контроль	-	-	6	0	10,8	-	+1,6

Препараты вводили внутрибрюшинно.

Резистентность к средству в озвученном оливковом масле возникла в 8-й, 6-й и 4-й генерациях соответственно. Чувствительность резистентных опухолей к препаратам-индукторам снижена в 4-5 раз.

Специальные исследования показали, что штаммы Р-388/рН и Р-388/вст обладают фенотипом и генотипом множественной лекарственной устойчивости:

1). Через 6 мес хранения противоопухолевого средства в озвученных оливковом масле и ненасыщенных жирных кислотах при температуре до 20° С – нет изменений.

2). В оливковом масле и ненасыщенных жирных кислотах – более длительный период хранения и более высокая доза.

3). В водном и физиологическом растворах средство гидролизуется в течении 30 дней при 20° С.

Как видно из данных таблиц, наиболее интересные результаты были получены на штаммах лейкемии Р-388 с генотипом множественной лекарственной устойчивости. Эти опухоли, на которые слабо действуют многие противоопухолевые химиопрепараты, оказались чувствительными в достаточной степени к предлагаемому средству (табл.7). Особо следует отметить высокую

чувствительность к средству лейкемии L-1210 (табл.5). Все животные опытной группы дожили до 60 суток после трансплантации опухоли, что соответствует полному их излечению. Свойства средства преодолевать лекарственную устойчивость организма является весьма ценным, так как, как правило, большинство известных противоопухолевых препаратов вызывают в организме резистентность.

Таблица 7

Влияние противоопухолевого средства в озвученном оливковом масле на продолжительность жизни мышей с лекарственно устойчивыми опухолями:

Штамм	Препарат	Доза, мг/кг	Режим (сутки после перевивки)	ILS**, %	Число выживших животных / Число животных в группе
P-388 (исходный штамм)	Комплекс	5	1-7	56	-
		10	1,5,9	419	5/6
		10	1,7	465	4/6
		15	1,7	447	5/6
Лекарственно-устойчивые опухоли***					
P-388/ph	Комплекс	5	1-7	189	2/6
P-388/vcr		5	1-7	516	5/6
P-388/cPt		5	1-7	193	-

**При определении ILS среднюю продолжительность жизни выживших животных принимали за 60 суток.

***Лекарственно-устойчивые опухоли были получены путем последовательной перевивки лейкоза P388 асцитными клетками, взятыми от мышей, леченных рубомицином (штамм P388/ph), винクリстином (P388/vcr) и цисплатиной (P388/cPt).

Иммуномодулирующие свойства противоопухолевого средства в экспериментах по увеличению антителообразующих клеток определялись на белых беспородных мышах весом 20 г. Мышей внутрибрюшинно иммунизировали эритроцитами барана 2×10^8 в 0,2 мл физраствора. Через полчаса после иммунизации мышам перорально вводили средство в 0,6 мл оливкового масла (0,3 мг/кг).

На 4-й день после иммунизации проводили постановку реакции ЕРНЕ. Животных забивали, извлекали селезенку и гомогенизировали в 10 мл раствора Хенкса. На чашки Петри с агарозой и эритроцитами барана сеяли 0,05 мл супензии клеток селезенки.

Эксперименты показали, что средство в исследованной дозе 0,3 мг/кг статистически достоверно ($p < 0,001$) увеличивает количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке иммунизированных животных. Так, если количество (АОК) в контрольной группе составляло $76000 \pm 4618,8$, то в опытной группе оно достигало $158000 \pm 6985,7$, что свидетельствует об иммуностимулирующем действии средства на процессы антителообразования (табл.8).

Иммуномодулирующие свойства средства в тестах второго уровня оценивались по количественному учету факторов, влияющих на миграционную активность лейкоцитов. Эксперимент проводился на белых беспородных мышах с асцитной опухолью Эрлиха.

Таблица 8

Влияние противоопухолевого средства на антителообразование

№№ п/п	АОК в 0,5 мл	АОК на селезенку	Среднее значение АОК на селезенку	M+m; p<0,001
	Контроль	Количество клеток		
1.	400	80000	76000±4618,8	0,001
2.	280	56000		
3.	440	88000		
4.	360	72000		
5.	420	84000		
6.	380	76000		
Опыт				
7.	720	144000	158000±6985,7	0,001
8.	800	160000		
9.	780	156000		
10.	680	136000		
11.	920	184000		
12.	840	168000		

Для сравнения средство вводили в липосомах из яичного лецитина на 6-й день перевивки. В крови животных методом РТМЛ (реакция трансформации миграции лейкоцитов) определялась спонтанная миграция лейкоцитов (SML), влияние аутологичной сыворотки на SML (SML-A), продукция факторов, угнетающих миграцию лейкоцитов (MIF), и альтернативного фактора, стимулирующего миграцию (MEF), при индукции КоnA в различных дозах. Перевивка опухоли (на 6 сутки) не влияет на SML, но в аутологичной сыворотке появляются факторы, угнетающие SML в два раза. По сравнению с опухолевыми контрольными мышами, функциональная активность клеток – продуцентов MIF снижается в 4,5 раза, а MEF – возрастает в 1,5 раза. Отношение функциональной активности Th/Ts уменьшается в 6 раз (в норме соотношение Т-хелперов к Т-супрессорам равно 2,25-2,26). Введение средства снижает показатели SML и MIF в два раза, а функциональное соотношение Th/Ts – в 5 раз. Введение средства увеличивает SML и MIF до нормы, оставляя продукцию MEF увеличенной по сравнению с контролем на 50%. Функциональное отношение Th/Ts снижается в 1,6 раз. Таким образом, установлено, что предлагаемое средство обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Общетоксическое действие средства изучалось согласно стандартам, принятым Фармакологическим комитетом РУЗ.

Исследование проводилось на 5 видах лабораторных животных и включало 14 различных показателей:

- Оценка анафилактической активности на морских свинках;
- Реакция гиперчувствительности замедленного типа;
- Реакция дегрануляции тучных клеток;
- Изучение острой токсичности на мышах;
- Изучение хронической токсичности на крысах;
- Оценка функционального состояния у крыс;

Влияние на состав периферической крови у крыс;
Влияние на антителообразование у мышей;
Оценка функционального состояния почек у крыс;
Патоморфологические исследования у крыс;
Оценка функционального состояния печени у крыс;
Изучение хронической токсичности на собаках;
Влияние на состав периферической крови у собак;
Влияние на показатели давления и дыхания у кошек.

Результаты исследований показывают, что предлагаемое противопухолевое средство в терапевтической дозе 5 мг/кг не вызывает глубоких изменений в составе периферической крови, не оказывает патологического влияния на функции печени и почек и не вызывает в органах и тканях специфических изменений. Кроме того, оно повышает устойчивость организма к ионизирующему излучению и не вызывает резистентность при длительном применении.

Автор



В.П.Татарский

Формула изобретения

Противоопухолевое средство, включающее комплекс ацетилацетоната меди с фармацевтическим препаратом, отличающееся тем, что в качестве фармацевтически приемлемого препарата используют мелфалан, полученный комплекс, обладающий иммуномодулирующим действием и не вызывающий лекарственную устойчивость организма, подвергают ультразвуковой диспергации в растительном масле или в ненасыщенных жирных кислотах.

Автор:



В.П. Татарский

Реферат описания изобретения

Противоопухолевое средство

Использование: медицина, преимущественно клиническая онкология.

Задача: создание противоопухолевого средства, обладающего также иммуномодулирующим действием и не вызывающего лекарственную устойчивость организма, растворимого в гидрофобных средах, с повышенной устойчивостью к окислению и гидролизу.

Сущность изобретения: противоопухолевое средство включает комплекс ацетилацетоната меди с фармацевтическим препаратом, в котором в качестве фармацевтически приемлемого препарата используют мелфалан, полученный комплекс, обладающий иммуномодулирующим действием, и не вызывающий лекарственной резистенции, подвергают ультразвуковой диспергации в растительном масле или в ненасыщенных жирных кислотах.